

原著論文

ラット後期精子細胞の tubulobulbar complex における
ポリユビキチン化シグナルの免疫電顕的局在

横 田 貞 記, 明 石 麻奈加

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

Immunoelectron Microscopic Localization of Polyubiquitination
Signals in the Tubulobulbar Complex of Rat Late Spermatids

Sadaki YOKOTA and Manaka AKASHI

(Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki International University)

Abstract

To approach to the involvement of the tubulobulbar complex in ubiquitin-proteasome degradation of unnecessary nuclear proteins, the localization of polyubiquitin and the proteasome was studied by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Polyubiquitin signals were localized to this device and the proteasome subunit was stained in the cytoplasm of Sertoli cells surrounding the device. The results suggest that the tubulobulbar complex participates in ubiquitin-proteasome degradation of unnecessary proteins during the rapid nuclear compaction of late spermatids.

Key words

Tubulobulbar complex, polyubiquitin signals, proteasome, immunoelectron microscopy

要 約

後期精子細胞の頭部には、核から隣接するセルトリ細胞の中に伸びる tubulobulbar complex (小管小胞複合体) と名付けられた複雑な構造が知られている。この構造ははじめ精子細胞頭部をセルトリ細胞に繫留する装置と考えられたが、後に酸ホスファターゼの存在から、核で不要になった物質を分解する装置と提案された。今回、われわれはこの装置にポリユビキチン化タンパク質のシグナルが存在することを免疫電顕法によりはじめて見出した。また、装置を取り巻くセルトリ細胞にプロテアソームが局在することも明らかになった。これらの事実は、後期精子細胞核の不要タンパク質がポリユビキチン化されて、セルトリ細胞に送られ、そこでプロテアソームで分解されることを示唆する。

キーワード

小管小胞複合体、ポリユビキチン化シグナル、プロテアソーム、免疫電顕

はじめに

精子形成過程は、大きく次の3つの期に分けられる。1) 精祖細胞が分裂増殖する期、2) 精母細胞の減数分裂期、3) 半数体の精子細胞が運動能をもつ遺伝子を卵に運ぶために特化する

期である¹⁾。精子形成のサイクルは、ラットでは 4 から 5 のステージに分けられ、各ステージの精細管断面には発達の特定の段階にある細胞群が見られる。精子細胞の発達段階は、細胞の形態的基準により、ラットでは1から19のス

トップに分けられる。3) の過程には、先体や鞭毛の形成^{2, 3, 4)}、核質の濃縮^{5, 6)}、大部分の細胞質の投棄があり^{7, 8)}、細胞は劇的な変化を遂げる。このようにして分化した精子細胞は精子になり、セルトリ細胞から分離して管腔に放出される。排精と呼ばれるこの過程は、一連の複雑な現象から成り、セルトリ細胞が深く関わっている^{4, 9, 10, 11, 12)}。成熟した精子細胞がセルトリ細胞から離脱するとき、精子細胞の頭部は分離しても、精子細胞の残余細胞質はセルトリ細胞の突起に取り囲まれている。Russell と Clermont¹³⁾ は、離脱中のラット精子細胞の頭部とセルトリ細胞の超微形態の関係を詳しく検討し、ステップ19の精子細胞頭部の腹側に接するセルトリ細胞の先端細胞質には、精子細胞から十数本の小管 (tubules) が伸びていて、その小管の遠位端は小胞 (bulbus) となり、一か所に集まっていることを示した。この構造を彼らは tubulobulbar complex (小管小胞複合体) と名付け、その役割として、精子細胞頭部をセルトリ細胞に係留する足場を提案した。Russell はラット精子形成サイクルのステージを3つのサブステージに分けて、この構造の形成過程を観察した¹⁴⁾。ステージ 初期にはセルトリ細胞の伸長した突起が精子細胞頭部全体を取り囲み、中期には頭部を部分的に囲むようになり、後期には頭部はセルトリ細胞から離脱する。さらに、リソソームとの関係を見るために、彼は酸ホスファターゼ活性の酵素組織化学を行ない、小管小胞構造の小管部分と小胞を取り巻くセルトリ細胞の食胞に酸ホスファターゼ活性を検出した¹⁵⁾。Russell は、離脱前の精子細胞頭部の減少を観察し、その70%が小管小胞構造の形成と吸収時期に消失することから、ステージの精子細胞核周囲の細胞質はこの構造を通してセルトリ細胞に運ばれ、分解されるというアイデアを提唱した¹⁵⁾。このような小管小胞複合体におけるリソソーム的性質 (酸ホスファターゼの存在) や急激大量の精子細胞頭部細胞質減少を考慮すると、この装置が分解系に関与する可能性

は高い。

細胞内の分解系は大きくリソソーム系^{16, 17)}とユビキチン・プロテアソーム系^{18, 19)}に分けられる。前者では、標的物 (細胞小器官など) を分離膜で取り囲み分離して、リソソームと融合し分解する¹⁷⁾。後者では、標的タンパク質は複数のユビキチン分子が結合され、それがシグナルとなって、タンパク分解装置・プロテアソームで分解される¹⁹⁾。小管小胞複合体とリソソーム系分解系との関連は上述のように、Russell によって示唆されたが、急速大量の分解が行われることを考慮すると、ユビキチン・プロテアソーム関与する可能性も否定できない。この問題に接近するには、ポリユビキチン化とプロテアソームのシグナルが小管小胞複合体に見られるかどうかを知る必要がある。そこで、この研究では、蛍光抗体法と免疫電顕法により、これら2つのシグナルが小管小胞複合体に局在するかどうかを調べた。結果は2つのシグナルがこの構造に局在することを明瞭に示し、小管小胞複合体が分解系に関与することを強く示唆した。

材料と方法

動物と抗体

オス Wistar ラット (200g) を用いた。動物は麻酔下、精巣を摘出した後、長崎国際大学動物実験指針により処理した。ポリユビキチン鎖 (P-Ub) に対するマウス単クローン抗体は日本バイオテスト研究所から、20S プロテアソームサブユニット (P-S) に対するウサギ抗体は Merck-Millipore 社から購入した。Alexa568 または488標識ヤギ抗-マウス IgG および抗-ウサギ IgG 抗体は Molecular Probes 社から得た。Protein A/G/L-金 15-nm プローブは先の方法により調製した²⁰⁾。

蛍光抗体染色

摘出したラット精巣をティッシュ・テックに埋めて、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、凍結ミクリローム (ライカミクロト-

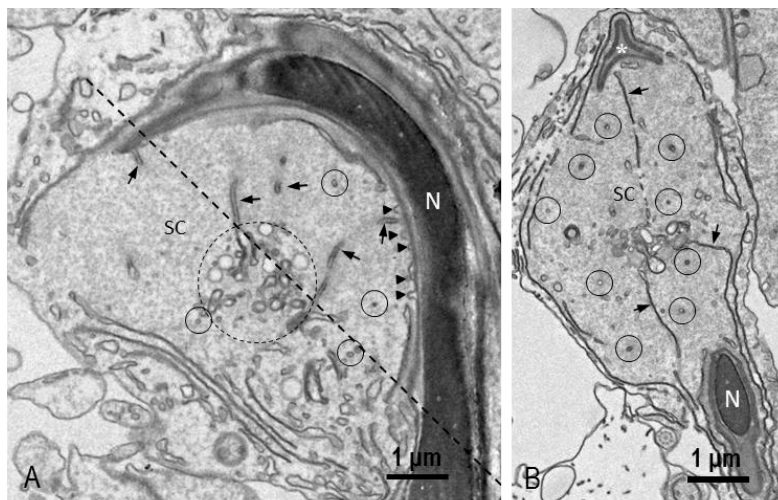


図1．ステップ19精子細胞頭部と隣接するセルトリ細胞。(A)縦断面。精子細胞核(N)から伸びる小管の縦断(矢印)と横断(小円内)が見られる。また、小管の遠位端は小胞になって集合している(破線内)。核側のセルトリ細胞膜には多数のピットが見られる(矢頭)。(B) Aに示すような斜めの破線で切られた断面。長く走る小管が核(N)と穿孔体(*)から出ている(矢印)。小管の遠位端は小胞を作っている。多数の横断された小管も見られる(円内)。Bar = 1 μ m

ム)で5ミクロン厚の切片にし、シリコンコート・ガラススライドにマウントした。乾燥後、4%パラホルムアルデヒド+0.02%CaCl₂+0.05M Hepes-KOH 緩衝液(pH 7.4)中で15分固定した。切片を0.2%Triton X-100+0.2% Saponin +PBSで15分浸透化し、2% fish gelatin+PBSで30分処理した。次に切片をマウス P-Ub 抗体(2,000倍希釈)またはウサギ P- S 抗体(500倍希釈)で1晩反応させ、PBSで洗った後、一次抗体に対応する Alexa568 または488標識ヤギ抗体(1,000倍希釈)+DAPI(10 μ g/ml)で60分インキュベートした。対照染色には一次抗体を省いて二次反応を行なった。PBSで洗った後、Mowiol-2.5% DABCO を滴下、カバーガラスで封入した。標本はニコン蛍光顕微鏡 Eclipse 600 で観察した。精細管の各分化段階は、Russellらの核の形態および細胞のプロファイルに照らして判定した²¹⁾。

免疫電顕染色

摘出したラット精巣を固定液(4%パラホルムアルデヒド+0.2%グルタルアルデヒド+0.05M

Hepes-KOH 緩衝液(pH 7.4)中で小ブロックにメスで切り、1時間4℃で固定した。PBSで洗浄後、-20℃で型通りエタノール脱水を行ない、LR White に包埋、紫外線下、-20℃で重合した。超薄切片を超マイクローム(ライカ・ウルトローム)にセットしたダイヤモンドナイフで切り、ニッケル・グリッドにマウントした。切片を2% fish gelatin で15分処理し一次抗体で1晩インキュベートして、15nmコロイド金-プロテイン A/G/L プローブで抗体を可視化した。切片を電子染色後、日立電子顕微鏡 H7650 で観察した。免疫染色の対照には一次抗体を省いて二次反応を行なった。

通常電顕試料の調製

摘出したラット精巣を固定液(4%パラホルムアルデヒド+1%グルタルアルデヒド+0.05M Hepes-KOH 緩衝液(pH 7.4)中で小ブロックにメスで切り、4℃で1時間固定した。PBSで洗浄後、1%還元オスミウムで1時間室温固定した。組織は型通りエタノールで脱水後、エポンに包埋し、60℃で2日樹脂を重合した。超薄

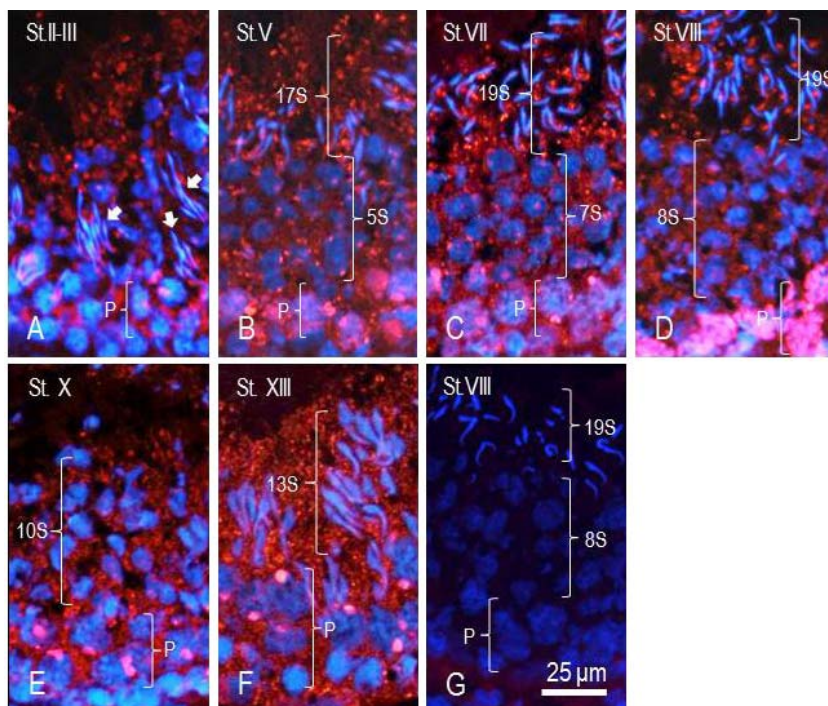


図2．精細管上皮におけるポリユビキチン化タンパク質の免疫蛍光染色。P-Ub（赤色）、核（青色）。(A)ステージⅡ-Ⅲの精細管。パキテン精母細胞（P）には、核にドット状、細胞質に瀰漫性の染色が見られる。ステップ16の精子細胞核は上皮内に深く入り込んでいる（矢印）。その長く伸びた細胞質にはドット状の染色が見られる。(B)ステージⅤの精細管。パキテン精母細胞（P）の核が斑に染色され、細胞質の染色も増加している。ステップ5の丸い精子細胞（5S）の核にドット状の染色、細胞質に瀰漫性の染色がある。ステップ17（17S）の精子細胞の細胞質には顆粒状の染色が見られる。(C)ステージⅦの精細管。精母細胞（P）の核および細胞質が強く染色されている。ステップ7の精子細胞（7S）の核がドット状に、細胞質が瀰漫性に染色されている。ステップ19精子細胞（19S）の核周辺にドット状の染色が見られる。(D)ステージⅧの精細管。精母細胞（P）に強い染色がある。ステップ8の精子細胞（8S）の核および細胞質が染色されている。ステップ19精子細胞（19S）核周辺にドット状の染色が見られる。(E)ステージⅩの精細管。精母細胞（P）、ステップ10の精子細胞（10S）が染色されている。(F)ステージⅩⅢの精細管。精母細胞（P）の細胞質に強いドット状の染色がある。ステップ13の精子細胞（13S）の細胞質が強く染色されている。(G)ステージⅧの精細管。対照染色。P-Ub染色はみられない。Bar = 25μm

切片を超ミクロトーム（ライカ・ウルトロトーム）にセットしたダイヤモンドナイフで切り、銅グリッドにマウントした。切片を電子染色後、日立電子顕微鏡 H7650 で観察した。

結 果

小管小胞複合体の通常電顕像

図1 Aに示すように、ステップ19の精子細胞頭部縦断面でみると、鎌状に湾曲した腹側部をセルトリ細胞の先端部が被っていた。セルトリ

細胞の細胞質はほぼ均一な微細粒子によって満たされていて、核辺縁から中心部に向かって走る小管と小管の横断面が見られた。小管の遠位端は膨らんで小胞を形成していた。核に接するセルトリ細胞の細胞膜には、多くのピットが見られた。アクロソームシステムから頸部に近い核を斜めに走る断面をみると、少数の小管と無数の小管の断面が見られた。小管の遠位端は小胞を形成していた（図1 B）。また、精子細胞頸部に近い部分を被うセルトリ細胞の細胞質に

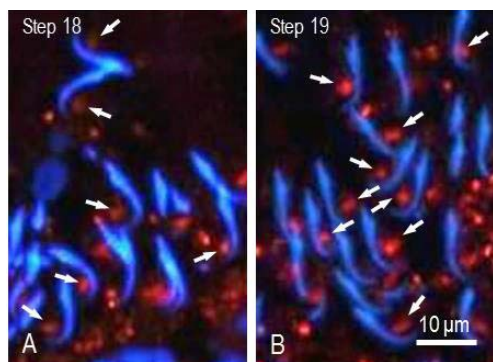


図3．後期精子細胞頭部領域のポリユビキチン化タンパク質の免疫蛍光染色。(A)ステップ18の精子細胞。多くのドット状のシグナルが鎌状核(青色)尖端に近い部分で見られる(矢印)。(B)ステップ19の精子細胞。染色は鎌状核腹側中央部に多く見られる(矢印)。Bar = 10μm

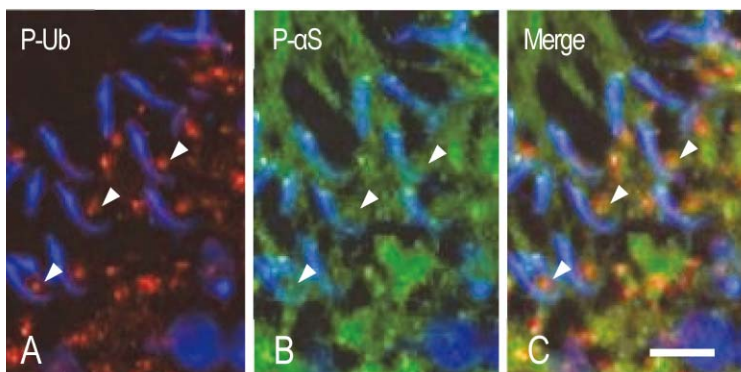


図4．ステップ19精子細胞におけるポリユビキチン化タンパク質(P-Ub、赤)とプロテアソーム・サブユニット(P-S、緑)の二重染色。A P-Ub。B P-S。C 両染色を重ねた画像。両染色が重なる染色部位は少ないが、存在する(矢印)。Bar = 20μm

は、細管や小胞が多数見られた(図1A)。これらの構造はこれまで報告されたものと一致していた¹³⁻¹⁵⁾。

蛍光抗体染色

ポリユビキチン鎖(P-Ub)シグナルはさまざまな精子形成細胞の核と細胞質に見られた。精祖細胞は細胞質が瀰漫性に弱く染色された。ステージ から の精母細胞は核と細胞質に弱い反応が見られ、ステージ になると、精母細胞の核に強いドット状と弱い網状の染色が見られた(図2A)。それらの染色はステージ でもっとも強くなった(図2B-D)。その後速やかに減少し、細胞質の染色が強まった。ステージ の精子細胞では、核と細胞質に小さなドット状の染色が見られた(図2A-D)。それらの染色はステージ でもっとも強かった。ステップ9-14の精子細胞では、核に弱い染色、細胞質に小顆粒状の染色が見られた(図2E、

F)。後者はステップ12-14で強くなった。ステップ15-17までに、精子細胞の伸びた細胞質内の染色は徐々に消失し、頭部を取り巻く領域(電顕的にはセルトリ細胞)に中等大の顆粒群として残り、ステップ19の精子細胞では、鎌状に湾曲した頭の腹側部に1個の球状の染色が残った(図2D)。ステップ18と19の精子細胞頭部を高倍率で観察すると、顆粒状のP-Ubシグナルは、ステップ18に精子細胞核先端より現れて、ステップ19になると、核腹側部中央に移動していた(図3A、B)。これらの染色は、一次抗体を省いて色素標識二次抗体を作用させた対照実験では、見られなかった。

P-Ubシグナルとプロテアソームとの関係を見るために、P-Ubと20Sプロテアソームのサブユニット(P-S)とを同一切片状で二重染色した。図4に示すように、ステップ19の鎌型精子細胞頭部腹側の顆粒の一部が両抗原に陽性であった。またP-Sは顆粒周辺に染色された。

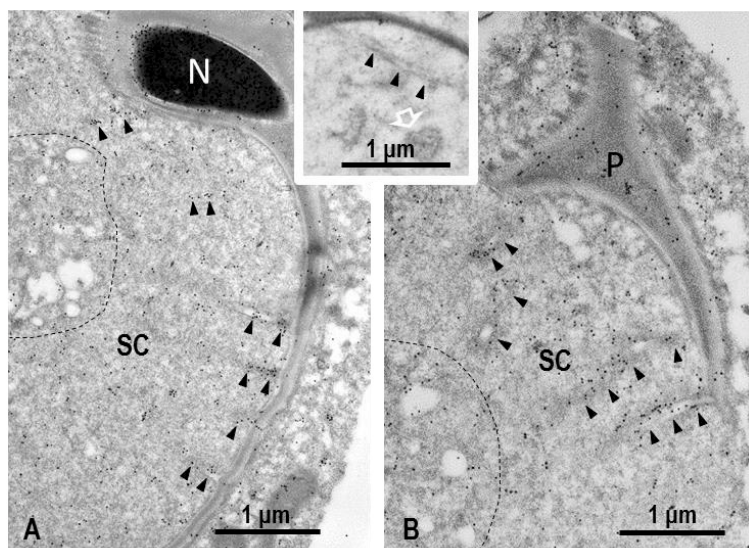


図5．ステップ19精子細胞の小管小胞複合体におけるポリユビキチン化タンパク質 (P-Ub) の免疫電顕染色。(A)P-Ub を示す金粒子は小管に一致して見られる(矢頭)。セルトリ細胞の細胞質(SC)にも金粒子は散在する。小管の遠位端の小胞の標識は少ないが、周辺のセルトリ細胞の細胞質には金粒子は多い(破線の囲み)。精子細胞核(N)には強いシグナルが見られる。(B)穿孔体(P)の入る横断面。P-Ub を示す金粒子は小管内腔とそれに接する暗い物質に見られる(矢頭)。小胞の集塊の標識は低い(破線の囲み)。穿孔体(P)にも標識が見られる。(差し込み図)対照染色。金粒子は小管(矢頭)にも小胞(矢印)にも見られない。Bar = 1 μ m

両染色とも、対照免疫染色実験では見られなかった。

免疫電顕染色

精子形成細胞における P-Ub シグナルの免疫電顕による観察は、すでに報告があるので²²⁾、今回は後期精子細胞とそれを取り囲むセルトリ細胞におけるシグナルに観察を集中した。ステップ19精子細胞頭部の腹側に隣接するセルトリ細胞では、P-Ub は、精子細胞核から伸びた小管内腔とそれを囲む電子密度の高い物質に局在した(図5 A、B)。小管の終端を形成する小胞の集まり周辺は弱く標識された(図4 A、B、破線内)。明るい小胞はほぼ陰性であった。ステップ19精子細胞核は P-Ub に強く染色された(図5 A)。また、P-Ub シグナルは穿孔体(perforatorium)にも見られた(図5 B)。次に、P-Ub とプロテアソームの関係を見るために、上述の部位における 20S プロテアソーム P- S の局在

を免疫電顕で観察した。P- S シグナルはセルトリ細胞の細胞質に分散していた。とくに小管の周辺に多い傾向があった(図6 A、矢頭)。また、小胞周辺にみられる電子密度の幾分高い小集塊が標識された(図6 A、B)。これらの標識は、一次抗体を省くと見られなかった。

考 察

精子形成(spermiogenesis)過程で、精子細胞が精細管に放出されるとき、その体積を25%減少することが知られている²³⁾。これは精子細胞の細胞質がちぎれることによって起こり、ちぎれた細胞質はセルトリ細胞に取り込まれて分解されると言われている^{23,24)}。核領域でみると、ステップ19精子細胞の核はそれ以前と比べて70%を失う¹⁵⁾。このような体積の減少には、合成を超える分解過程が必須であり、それを支えているのは活発なタンパク分解である。このような現象に関わると考えられる細胞内のタンパク分

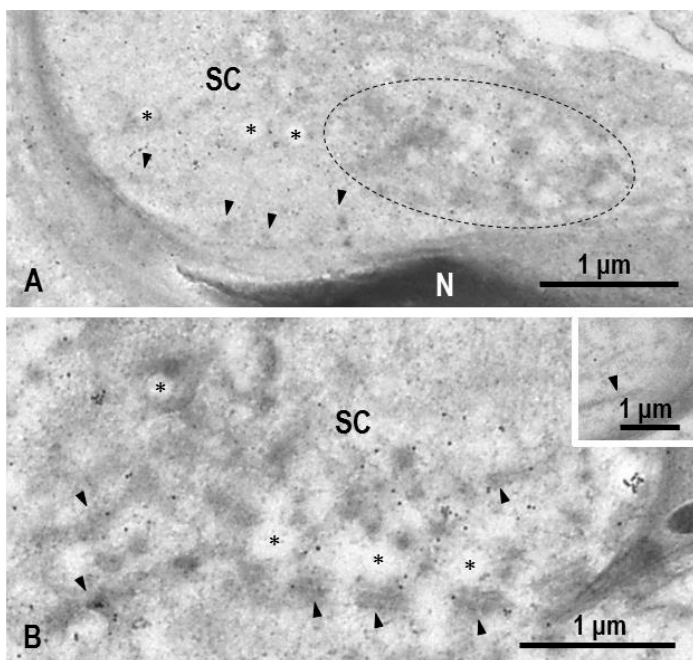


図6 . ステップ19精子細胞におけるプロテアソーム・サブユニット (P- S) の免疫電顕染色。(A) P- S を示す金粒子は精子細胞核に接するセルトリ細胞の細胞質 (SC) 全体に散在するが、小管 (矢頭) の近辺および小胞集塊 (破線楕円内) に多い傾向がある (矢印)。明るい小胞 (*) は陰性。核 (N) には標識が少ない。(B) 精子細胞頭部横断面。電子密度のやや高い物質上とその周辺に標識が見られる (矢頭)。明るい小胞 (*) は陰性。(差し込み図) 対照染色。小管 (矢頭) 周辺に標識は見られない。Bar = 1 μ m

解系には、リソソーム系とユビキチン-プロテアソーム系がある。ちぎれた細胞質を取り込み分解するセルトリ細胞の分解系は、貪食した物質を分解するリソソーム系分解に関わることが示唆されている²⁵⁾。一方、Russell は精子細胞核の70%の減少にリソソーム系が関与することを提起した¹⁵⁾。その根拠は、ステップ19の精子細胞頭部腹側から出て、隣接するセルトリ細胞に侵入する小管小胞複合体にリソソーム酵素の酸ホスファターゼ活性が検出されることであった。

今回、われわれは同複合体の小管部にポリユビキチン化シグナルを初めて検出した。このことは、小管内にポリユビキチン化されたタンパク質が存在することを示している。ポリユビキチン化タンパク質はプロテアソームの19S複合体のユビキチンリセプターで認識補足されて、プロテアソームに送り込まれ、分解される²⁶⁾。

したがって、小管に存在するユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームで分解されると考えられる。今回、小管およびその周辺におけるプロテアソームの局在を知るために、プロテアソームのサブユニット抗体を用いて免疫染色を行なったが、結果はポリユビキチン化タンパク質の局在とプロテアソームのそれが一部一致し、小管周辺を含むセルトリ細胞の細胞質には染色が見られたので、小管に検出されたポリユビキチン化タンパク質は、何らかの方法でセルトリ細胞に移行し、そこに存在するプロテアソームに補足され分解されるものと考えられる。

小管に検出されたユビキチン化タンパク質の由来は核質とそれをかこむ細胞質と考えられる。ステップ19の精子細胞核におけるポリユビキチン化タンパク質の強いシグナルはすでに報告されているだけでなく²²⁾、今回も観察された。急

速な核濃縮に伴って生じるとされる核の不要なタンパク質は、ポリユビキチン化され、核周囲に運ばれ、小管小胞複合体によってセルトリ細胞に移行してプロテアソームで分解されられる。

文 献

- 1) Guraya, S. S. (1987) *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. Springer-Verlag, Berlin. PP. 55-168.
- 2) Burgos, M. H., Fawcett, D. W. (1955) Studies in the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis Domestica*). *Biophys. Biochem. Cytol.* 1, PP. 287-315.
- 3) Abou-Halia, A., Tulsiani, R. P. (2000) Mammalian sperm acrosome: Formation, contents, and function.' *Arch. Biochem. Biophys.* 379, PP. 173-182.
- 4) Fawcett, D. W., Phillips, D. M. (1969) The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon.' *Anat. Rec.* 165, PP. 153-184.
- 5) Ward, W. S., Coffet, D. S. (1991) DNA packaging and organization of in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells.' *Biol. Reprod.* 44. PP. 569-574.
- 6) Ward, W. S. (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development.' *Mol. Hum. Reprod.* 16, PP. 30-36.
- 7) Sharpe, R. M., Maguire, S. M., Saunders, P. T. K., Millar, M. R., Russell, L. D., Garten, D., Bachmann, S., Mullins, L., Mullins, J. J. (1995) ' Infertility in a transgenic rat due to impairment of cytoplasmic elimination and sperm release from the Sertoli cells.' *Biol. Reprod.* 53, PP. 214-226.
- 8) Rengan, A. K., Agarwal, A., van der Linde, M., du Plessis, S. S. (2012) An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet.' *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, PP. 2-8.
- 9) Sapsford, C. S., Rae, C. A. (1969) Ultrastructural studies on Sertoli cells and spermatids in the bandicoot and ram during the movement of mature spermatids into lumen of the seminiferous tubule.' *Aust. J. Zool.* 17, PP. 415-445.
- 10) Fouquet, J. P. (1972) Le m é canisme de la spermiation chez le hamster: signification des relations entre cellules de Sertoli et spermatids.' *C.R. Acad. Sc. D* 275, PP. 2025-2026.
- 11) Fouquet, J. P (1974) La spermiation et la formation des corps residuels chez le hamster: role des cellules de Sertoli.' *J. Microscopie* 19, PP. 161-168.
- 12) Fawcett, D. W. (1975) *Ultrastructure and function of the Sertoli cell*. In: *Handbook of Physiology. Male reproductive system. Vol. V. Section 7: Endocrinology.* DW Hamilton and RO Greep, eds. American Physiological Society, Washington, DC Waverly Press Inc Baltimore, Maryland, PP. 21-55.
- 13) Russell, L., Clermont, Y. (1976) Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules.' *Anat. Rec.* 185, PP. 259-278.
- 14) Russell, L. (1979) Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis.' *Anat. Rec.* 194, PP. 213-232.
- 15) Russell, L. D. (1979) Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat.' *Anat. Rec.* 194, PP. 233-246.
- 16) Mortimore, G. E., P ö s ö , A. R. (1984) Lysosomal pathway in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids.' *Fed. Proc.* 3, PP. 1289-1294.
- 17) Dunn, Jr. W. A. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation.' *Trend. Cell Biol.* 4, PP. 139-143.
- 18) Herskho, A., Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation.' *Ann. Rev. Biochem.* 6, PP. 761-807.
- 19) Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation.' *Current Opinion Cell Biol.* 7, PP. 315-223.
- 20) Yokota, S. (2012) *Preparation of colloidal gold particles and conjugation of Protein A, IgG, F (ab')₂, and Streptavidin.* In: Schwarzbach SD, Osafune

- T, editors. *Immunoelectron Microscopy. Methods and Protocols*. New York, Springer, PP. 109–119.
- 21) Russell. L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., Clegg, E. D. (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Florida: Cache River Press, PP. 62–120.
- 22) Haraguchi, C. M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Tokumoto, T., Hoshi, K., Yokota, S. (2007) Possible function of caudal nuclear pocket: Degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm.' *J. Histochem. Cytochem.* 56, PP. 585–595.
- 23) Sparando, R. L., Russell, L. D. (1987) Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species.' *Am. J. Anat.* 185, PP. 72–80.
- 24) Fawcett DW, Phillips DM (1969) Observation on the release of spermatozoa and changes in the head during passage through the epididymis.' *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 6), PP. 405–418.
- 25) Kerr, J. B. Kretser, D. M. (1974) The role of the Sertoli cell in phagocytosis of residual bodies of spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 36, PP. 439–440.
- 26) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85, PP. 12–36.